

中華民國經濟部智慧財產局

INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE  
MINISTRY OF ECONOMIC AFFAIRS  
REPUBLIC OF CHINA

茲證明所附文件，係本局存檔中原申請案的副本，正確無訛，  
其申請資料如下：

This is to certify that annexed is a true copy from the records of this  
office of the application as originally filed which is identified hereunder:

申請日：西元 2003 年 01 月 15 日  
Application Date

申請案號：092100821  
Application No.

申請人：國立台灣大學  
Applicant(s)

局長  
Director General

蔡練生

發文日期：西元 2003 年 4 月 23 日  
Issue Date

發文字號：09220404400  
Serial No.

申請日期：	IPC分類
申請案號：	

(以上各欄由本局填註)

## 發明專利說明書

一、 發明名稱	中 文	結合RCA訊號放大系統之奈米探針的蛋白質微陣列光學檢測方法
	英 文	RCA Combined Nanoparticle-Based Optical Detection Technique for Protein Microarray
二、 發明人 (共2人)	姓 名 (中文)	1. 黃義侑 2. 許馨云
	姓 名 (英文)	1. Yi-You Huang 2. Hsin-Yun Hsu
	國 籍 (中英文)	1. 中華民國 TW 2. 中華民國 TW
	住居所 (中 文)	1. 台北市信義區黎安里1鄰和平東路三段509巷15號4樓 2. 台北縣板橋市大豐街6號
	住居所 (英 文)	1. 4F1., No. 15, Lane 509, Sec. 3, Heping E. Rd., Taipei, Taiwan 110, R.O.C. 2. No. 6, Ta-Feng Str., Panchiao, Taipei, Taiwan 220, R.O.C.
三、 申請人 (共1人)	名稱或 姓 名 (中文)	1. 國立台灣大學
	名稱或 姓 名 (英文)	1. National Taiwan University
	國 籍 (中英文)	1. 中華民國 TW
	住居所 (營業所) (中 文)	1. 台北市羅斯福路四段1號 (本地址與前向貴局申請者相同)
	住居所 (營業所) (英 文)	1. No. 1, Sec. 4, Luosfu Rd., Taipei, Taiwan 106, R.O.C.
	代表人 (中文)	1. 陳維昭
	代表人 (英文)	1. Wei-Jao Chen



四、中文發明摘要 (發明名稱：結合RCA訊號放大系統之奈米探針的蛋白質微陣列光學檢測方法)

本發明提供一種蛋白質微陣列光學檢測方法，係包含下列步驟：提供一捕捉分子；以該捕捉分子辨識該蛋白質微陣列上之一生物分子；提供一引子，並與該捕捉分子連接；利用一滾動環形放大系統將該捕捉分子上之該引子之訊號放大；以及以一奈米金粒探針偵測經放大之該引子之訊號。

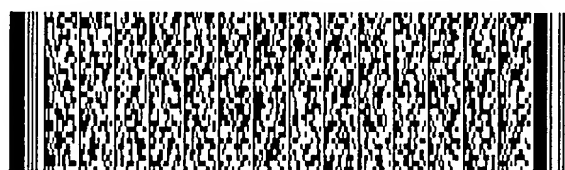
五、(一)、本案代表圖為：第一圖

(二)、本案代表圖之元件代表符號簡單說明：

10：蛋白質微陣列	11：生物分子
12：連結分子	20：捕捉分子
21：引子	30：DNA聚合酶
31：環形模板	40：奈米金粒探針
401：單股寡核苷酸	402：奈米金粒

六、英文發明摘要 (發明名稱：RCA Combined Nanoparticle-Based Optical Detection Technique for Protein Microarray)

The present invention provides an optical detection method for a protein microarray. The method includes the steps of providing a capture molecule, recognizing a biomolecule on the protein microarray by the capture molecule, providing a primer to connect with the capture molecule, amplifying the signal of the primer on the capture molecule by a rolling circle amplification system,



四、中文發明摘要 (發明名稱：結合RCA訊號放大系統之奈米探針的蛋白質微陣列光學檢測方法)

六、英文發明摘要 (發明名稱：RCA Combined Nanoparticle-Based Optical Detection Technique for Protein Microarray)

and detecting the amplified signal of the primer by a nanogold probe.



一、本案已向

國家(地區)申請專利

申請日期

案號

主張專利法第二十四條第一項優先權

無

二、☐主張專利法第二十五條之一第一項優先權：

申請案號：

無

日期：

三、主張本案係符合專利法第二十條第一項☐第一款但書或☐第二款但書規定之期間

日期：

四、☐有關微生物已寄存於國外：

寄存國家：

寄存機構：

寄存日期：

寄存號碼：

無

☐有關微生物已寄存於國內(本局所指定之寄存機構)：

寄存機構：

寄存日期：

寄存號碼：

無

☐熟習該項技術者易於獲得,不須寄存。



## 五、發明說明 (1)

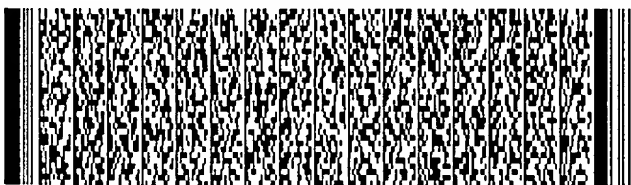
### 發明所屬之技術領域

本案係關於一種蛋白質微陣列光學檢測方法，尤其是關於一種結合RCA訊號放大系統之奈米探針的蛋白質微陣列光學檢測方法。

### 先前技術

自從DNA微陣列 (DNA microarray) 的研發有了開創性的突破，蛋白質微陣列 (Protein microarray) 晶片的研發也成為目前許多研究團隊致力開發的新方向。優良性能以及具高效性的微陣列晶片檢測器，長久以來是許多研究者所專心致力的目標。目前，在醫學實驗的領域中，免疫檢驗用於定量是最熱門且具影響力的分析技術。抗體分子 (antibody) 提供分析的專一性 (specificity)，即以抗體分子辨識相對應之抗原 (antigen)。在大多數免疫檢驗系統，一個關鍵的特色是具有一固相基板 (solid phase)。設計此基板的目的是，在於此一設置可便於流洗和分離步驟，並且可作為抗體或抗原分子固定化時的基質。另一個重要的特徵藉以偵測特定分子的結合關係，一常用方式是使用標示分子 (label)。目前最普遍使用的方法有放射性標示 (radioisotope)、螢光 (fluorescence) 以及酵素 (enzyme) 方法。

直至目前為止，在所有的檢驗套組中，其缺點之一是複雜的處理程序以及靈敏度的喪失。放射性標示由於其固有存在已知的安全性問題，以及接連衍生的廢料處理爭



## 五、發明說明 (2)

議，是目前多數研究者欲避免使用的，也因此螢光標示成為現今較被人廣為使用在標準微陣列應用時所選擇的方式。雖然受限於需要高度精密且昂貴的螢光顯微鏡和掃描器以及受強烈環境因子所左右，但仍未有其他讀取偵測訊號的新方法或標準可取代螢光的偵測。然而，螢光的低強度仍對定量的測量造成一大挑戰，螢光的低穩定性，以及褪色問題 (bleaching problem)，都是令人詬病之處。

因此，本發明係針對習用技術之缺失，提供一種新的偵測方法，即使用奈米金粒 (nanogold particles) 作為標示來進行蛋白質微陣列晶片偵測。

### 發明內容

本發明之目的係提供一種蛋白質微陣列光學檢測方法，其係利用滾動環形放大系統配合奈米金粒之技術來偵測蛋白質微陣列，以提高光學檢測之靈敏度。

為達上述目的，本發明提供一種蛋白質微陣列光學檢測方法，係包含下列步驟：提供一捕捉分子；以該捕捉分子辨識該蛋白質微陣列上之一生物分子；提供一引子，並與該捕捉分子連接；利用一滾動環形放大系統將該捕捉分子上之該引子之訊號放大；以及以一奈米金粒探針偵測經放大之該引子之訊號。

如所述之方法，其中該捕捉分子為抗體、生物標示分子，如腫瘤標示分子、蛋白質接受體、糖基、或胜肽。

如所述之方法，其中該生物分子為抗原、配基分子、



### 五、發明說明 (3)

蛋白質、糖基、或胜肽。

如所述之方法，其中該引子為一單股寡核苷酸，其序列片段長度為20~80 bp，較佳為25~45 bp。

如所述之方法，其中該引子之5'端修飾有胺基，以與該捕捉分子連接。

如所述之方法，其中該滾動環形放大系統包含一DNA聚合酶、一環形模板及一核苷酸原料。

如所述之方法，其中該環形模板具有與該引子互補之序列，而可與該引子雜合。

如所述之方法，其中該滾動環形放大系統係藉由該DNA聚合酶之作用，產生一連接於該引子之具多個與該環形模板之序列互補之重複片段的DNA分子。

如所述之方法，其中該環形模板之核苷酸序列片段長度為25~100 bp，較佳為30~50 bp。

如所述之方法，其中該奈米金粒探針係為一以一單股寡核苷酸修飾之奈米金粒。

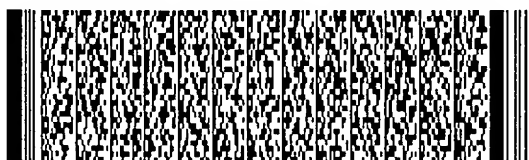
如所述之方法，其中該單股寡核苷酸之序列片段長度為10~60 bp，較佳為15~25 bp。

如所述之方法，其中該單股寡核苷酸之5'端修飾有-SH基，其與該奈米金粒表面具強反應性。

如所述之方法，其中該奈米金粒係為圓形或多面體型。

如所述之方法，其中該奈米金粒係以下列方法製得：

a. 將一玻璃器皿以王水浸泡，再以去離子水洗淨後烘





#### 五、發明說明 (4)

乾；

b. 製備 $\text{HAuCl}_4$ 水溶液，並進行加熱回流至煮沸；

c. 快速加入一還原劑，以還原金離子成金；

d. 俟該水溶液顏色轉變為暗紅色，再繼續回流 15 分鐘後，置於冰上冷卻；以及

e. 以一過濾器過濾，或再進行透析除去鹽類等雜質後，儲存於  $4^\circ\text{C}$  下而製得。

如所述之方法，其中步驟c之該還原劑為檸檬酸鈉水溶液，且可依欲製備之該奈米金粒大小不同而調整其添加量者。

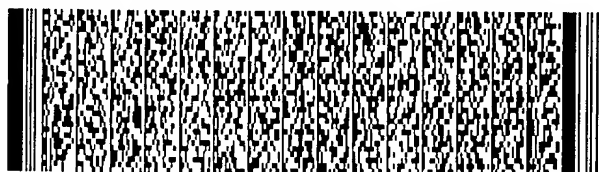
如所述之方法，當製備直徑約16 nm之該奈米金粒時，約需加入1 mL，1 %之該檸檬酸鈉水溶液。

如所述之方法，其中步驟c之該還原劑為單寧酸，以還原製備粒徑小於5 nm之該奈米金粒。

如所述之奈米金粒，其中該金粒之大小為1 nm到100 nm，較佳為5 nm到30 nm。

如所述之方法，其中該生物分子係藉由一連結分子，其為C3～C12之烷鏈，一端修飾有-SH基，另一端則修飾-COOH基，並以SMPB、EDC/NHS作為反應交聯劑而固定於該微陣列上。

本發明另一方面提供一種蛋白質微陣列光學檢測系統，係包含：一捕捉分子，係用以辨識該蛋白質微陣列上之一生物分子；一引子，係與該捕捉分子連接；一滾動環形放大系統，係用以放大該捕捉分子上之該引子之訊號；



##### 五、發明說明 (5)

以及一奈米金粒探針，係用以偵測經放大之該引子之訊號。

如所述之系統，其中該捕捉分子可為抗體、生物標示分子，如腫瘤標示分子、蛋白質接受體、糖基、或胜肽。

如所述之系統，其中該生物分子為抗原、配基分子、蛋白質、糖基、或胜肽。

如所述之系統，其中該引子為一單股寡核苷酸，其序列片段長度為20~80 bp，較佳為25~45 bp。

如所述之系統，其中該引子之5'端修飾有胺基，以與該捕捉分子連接。

如所述之系統，其中該滾動環形放大系統包含一DNA聚合酶、一環形模板及一核苷酸原料。

如所述之系統，其中該環形模板具有與該引子互補之序列，而可與該引子雜合。

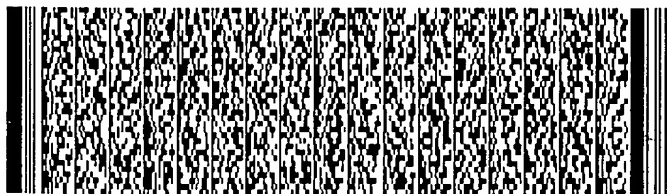
如所述之系統，其中該滾動環形放大系統係藉由該DNA聚合酶之作用，產生一連接於該引子之具多個與該環形模板之序列互補之重複片段的DNA分子。

如所述之系統，其中該環形模板之核苷酸序列片段長度為25~100 bp，較佳為30~50 bp。

如所述之系統，其中該奈米金粒探針係為一以一單股寡核苷酸修飾之奈米金粒。

如所述之系統，其中該單股寡核苷酸之序列片段長度為10~60 bp，較佳為15~25 bp。

如所述之系統，其中該單股寡核苷酸之5'端修飾有-



## 五、發明說明 (6)

SH 基，其與該奈米金粒表面具強反應性。

如所述之系統，其中該奈米金粒係為圓形或多面體型。

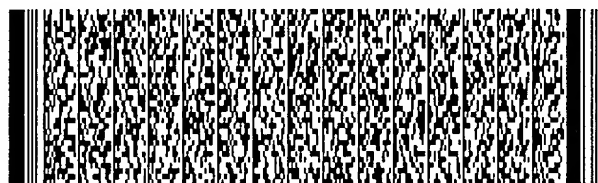
如所述之系統，其中該生物分子係藉由一連結分子，其為 C3 ~ C12 之烷鏈，一端修飾有 -SH 基，另一端則修飾 -COOH 基，並以 SMPB、EDC/NHS 作為反應交聯劑而固定於該微陣列上。

本案得藉由下列實施方式與圖式說明，俾得一更清楚之瞭解。

### 實施方式

本發明強大功能來自於抗體分子對特定抗原免疫結合區 (antigenic epitopes) 具有的高度專一性。許多來自於癌症、傳染性的疾病，或生化反應過程中重要的生物標記 (biomarker) 的例子顯示其濃度在體液或組織中過低，以致於以一般傳統免疫檢驗分析難以偵測得到。尤其是那些僅有少量、有限的樣品材料，或當抗原密度極低時，會要求更高的靈敏度和專一性。而本發明則使用最新提出之滾動環形訊號放大 (rolling circle amplification, RCA) 系統配合奈米金粒之技術來偵測蛋白質微陣列，以提高免疫檢驗分析之靈敏度。

本發明所使用的滾動環形放大系統是以 DNA 聚合酶 (DNA polymerase) 作為訊號放大的驅動者，在等溫條件下 (isothermal conditions)，可以線性或幾何動力學



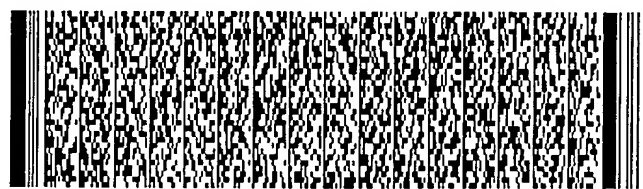
## 五、發明說明 (7)

(linear / geometric kinetics) 方式複製環形的核苷酸模板。使用單一或數個引子 (primer)，RCA系統可以在數分鐘內產生數百個串連的環形模板重複序列。在滾動環形放大系統中配合了抗體/抗原的免疫反應辨認，引子的 5' 端與抗體連接，在有環形DNA模板、DNA聚合酶，以及核苷酸原料的情況下，RCA系統反應產生一連接於抗體分子上具多個與環形模板序列互補之重複片段 (tandemly repeats) 的DNA分子。放大的DNA可藉由許多方法來偵測，包括直接於原料加入半抗原 (hapten) 或螢光標示的核苷酸或與螢光、酵素標示的互補核苷酸探針雜合

(hybridize)。本發明使用的偵測方法，是配合核苷酸修飾的奈米金粒作為偵測的探針，是故，本發明的偵測技術可成為分子辨識 (如：抗體-抗原免疫反應) 之交互作用反應訊號放大的一嶄新方法。

請參閱第一圖，其係顯示根據本發明之一較佳實施例之蛋白質微陣列光學檢測方法。該方法係提供一捕捉分子20，用以辨識蛋白質微陣列10上之一生物分子11。其中，該捕捉分子20可為抗體、生物標示分子，如腫瘤標示分子、蛋白質接受體、糖基、或胜肽；而該生物分子11可為抗原、配基分子、蛋白質、糖基、或胜肽。再提供一引子21，其為一單股寡核苷酸，序列片段長度為20~80 bp，較佳為25~45 bp。而該引子21之5'端修飾有胺基，使其易於與該捕捉分子20連接。

接著利用一滾動環形放大系統將該捕捉分子20上之該

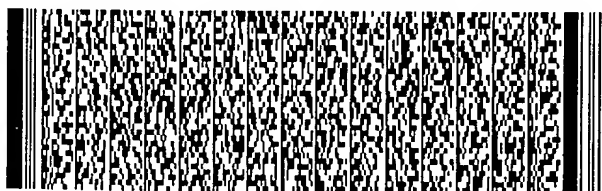


#### 五、發明說明 (8)

引子21之訊號放大。該滾動環形放大系統包含一DNA聚合酶30、一環形模板31及一核苷酸原料(未顯示)。該環形模板31之核苷酸序列片段長度為25~100 bp,較佳為30~50 bp,且其中具有與該引子21互補之序列,而可與該引子21雜合,進而藉由該DNA聚合酶30之作用,產生一連接於該引子21之具多個與該環形模板31之序列互補之重複片段的DNA分子。

因此,該捕捉分子20與該蛋白質微陣列10上生物分子11之反應訊號可藉由上述放大之DNA而放大,再利用一奈米金粒探針40來偵測該放大之DNA。該奈米金粒探針40係為一以一單股寡核苷酸401修飾之奈米金粒402。其中,該奈米金粒402係為圓形或多面體型,而該單股寡核苷酸401之序列片段長度為10~60 bp,較佳為15~25 bp,且其5'端修飾有-SH基,故與該奈米金粒表面具強反應性。由於該單股寡核苷酸401具有與該放大之DNA互補之序列,故可藉由該互補序列之雜合作用進一步偵測該蛋白質微陣列10之反應訊號。

再者,由於奈米金粒探針與互補之目標序列雜合的訊號落在可見光,故可容易的被偵測到,而不需要精密昂貴的螢光設備。藉使用hydroquinone將銀離子還原成銀金屬的作用(silver enhancement)技術,靈敏度更可大幅提高,且蛋白質晶片訊號甚至可藉由一般傳統平台掃描器而檢測到。故本發明所要建構說明的是一個以奈米金粒標示分子作為探針的光學方法,而用以偵測在微小化晶片表面

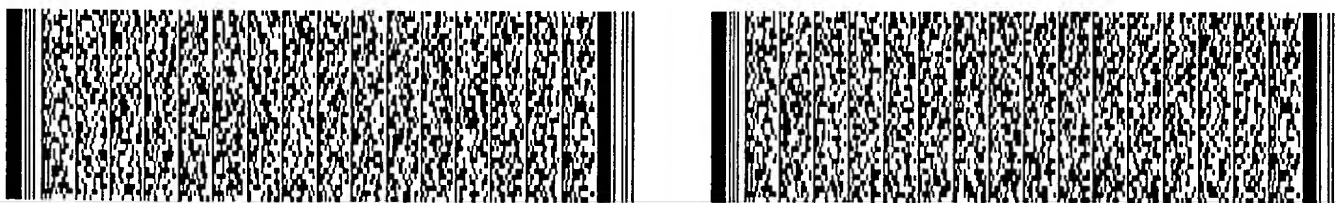


## 五、發明說明 (9)

特定蛋白質分子結合交互作用的新設計。此系統將結合晶片固定化技術及一訊號放大系統，使高效率平行大量檢測技術成為可能。

本發明中以奈米金粒探針作為檢測方式的優點是此種偵測方法依據表面電漿共振 (Surface Plasmon Resonance, SPR) 現象之原理，可避免使用螢光、或放射性同位素。由於金粒與生物分子的高度相容性，樣品的穩定性可大幅提昇。相較於螢光物質的靈敏度以及其褪色漂白的問題，測量螢光時受限於只有短暫的偵測時間，必須盡快進行測定，而奈米金粒則較無此顧慮，經過過濾及透析的步驟，奈米金粒溶液可於4 °C下存放數月。穩定性的增加使得長時間，或多次重複的樣品分析成為可能。化學性與物理性環境對於訊號強度的影響也大幅被降低，因此實驗結果的再現性 (reproducibility) 可被強化，故不同分析試驗與晶片檢測結果之間提供了較高的可比較性 (comparability)，亦提供了微小化

(miniaturization) 製程時可應用的潛力。使用奈米金粒標示分子所提供的高訊雜比 (signal-to-noise ratio) 優點顯示相較於以螢光顯色的晶片微陣列，將佈點大小限制向下延伸至次微米以下 (sub-micrometer) 的可能性增加。在平行分析上，一重大改變是微陣列的佈點排列密度可提高至原來的好幾個數量級以上。此技術顯示奈米金粒極具潛力作為微陣列晶片上特定生物分子交互作用的偵測。此方法使光學偵測的讀取應用上不再需要螢光



## 五、發明說明 (10)

的設備，從而提供了一個在晶片檢測系統上全新的領域與方向。

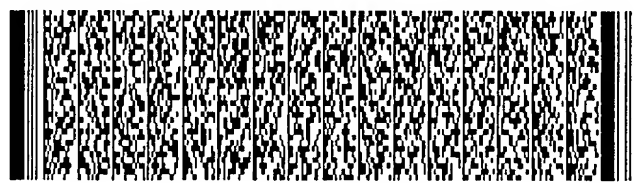
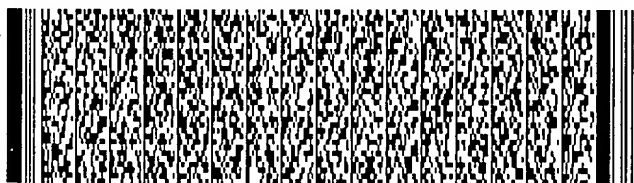
本發明的特點與優點例示於下面的實施例中，其包含特定的材料與用量，但不應不當地限制本發明。

### 實施例一：奈米金粒的製備

直徑約16 nm之奈米金粒製備 (citrate reduction of  $\text{HAuCl}_4$ )：

使用前所有的玻璃器皿先以王水 (aqua regia, 3 parts  $\text{HCl}$  + 1 part  $\text{HNO}_3$ ) 浸泡，再以去離子水 ( $\text{ddH}_2\text{O}$ ) 清洗後烘乾。製備  $\text{HAuCl}_4$  (0.01 %, 50 mL) 水溶液，進行加熱回流 (reflux) 至煮沸，而後快速加入 1 mL, 1 % 檸檬酸鈉水溶液 (trisodium citrate)，此為還原劑，可將金離子還原成金。溶液顏色會由淡黃變成暗紅色。待顏色轉變後，溶液繼續再回流 15 分鐘，然後冷卻置於冰上，以 0.22 mm nylon filter 過濾，再進行透析除去鹽類等雜質，於 4 °C 下儲存。所製得之奈米金粒 TEM 圖如第二圖所示。

至於其他不同顆粒大小的奈米金粒製備方法類似前面所述，唯還原劑之種類及添加量可依欲配製顆粒大小不同而改變。例如可用單寧酸作為還原劑，來還原製備粒徑小於 5 nm 之奈米金粒。而適合於本發明之奈米金粒大小為 1 nm 到 100 nm，較佳為 5 nm 到 30 nm。



## 五、發明說明 (11)

### 實施例二：金粒修飾技術

寡核苷酸修飾之奈米金粒製備 (oligonucleotide modified nanogold particle)：

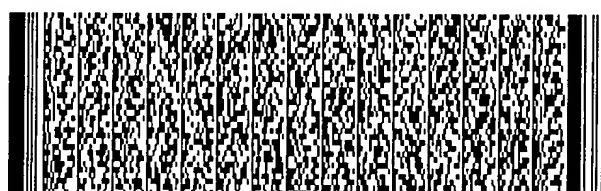
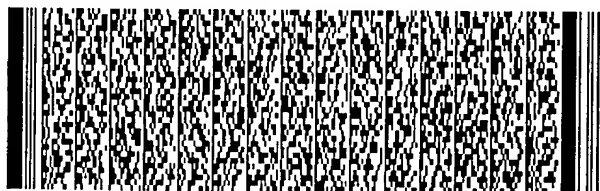
將5 mL 奈米金粒水溶液與合成好之寡核苷酸 (最終濃度約3.1 mM，即第三圖中1 x probe濃度) 溶液混合後靜置16 小時，而後，再置於0.1 M NaCl 以及10 mM phosphate buffer (pH 7) 中，靜置40 小時。以14000 rpm 離心25 min，去除上清液後得到暗紅色油狀物沉澱，以5 mL 之0.1 M NaCl 與10 mM phosphate buffer (pH 7) 流洗，再離心除去上清液，重新加入5 mL，0.3 M NaCl / 10 mM phosphate buffer (pH 7) / 0.01% azide solution，打散沉澱，使其均勻混合，即配製好所要之探針溶液。

第三圖為經寡核苷酸修飾後之奈米金粒光譜分析圖。圖中分別表示以0、1/2、1 及2 x probe (1 x probe 相當於3.1 mM 之寡核苷酸) 修飾之奈米金粒吸收光譜 (曲線 51、52、53 及54)，由圖中奈米金粒在520 nm 處特徵吸收峰下降程度，可計算奈米金粒表面修飾程度。

此外，本發明之寡核苷酸修飾之奈米金粒探針具有重新回收再利用的可行性。

### 實施例三：配合奈米金粒的滾動環形晶片訊號放大系統

訊號放大的反應混和液 (50 mL) 中含0.05 / 0.06 nmole 環形模板 / 引子 (5' 端已修飾有胺基，使易於與捕





#### 五、發明說明 (12)

捉分子連接，如抗體)，1mM dNTP，1X Reaction Buffer (10 mM Tris-HCl (pH7.5)，5 mM  $MgCl_2$ ，7.5 mM dithiothreitol)，DNA聚合酶(本例中為E.coli DNA Polymerase I， $\sim 5$  units)，加ddH<sub>2</sub>O至總反應液為50 mL，於37℃下水浴1 hr。

訊號放大後奈米金粒之TEM圖如第四圖所示。而第五圖則是以電泳再次確認RCA放大之產物。

#### 實施例四：奈米金粒光學檢測

固定生物分子方法係利用C3～C12之烷鏈之連結分子(linker) 12，其一端修飾有-SH基，另一端則修飾-COOH基，並以SMPB、EDC/NHS作為反應交聯劑，使DNA或蛋白質等生物分子固定於基板上。而後配合上述RCA訊號放大技術，以修飾好之奈米金粒進行檢測。檢測由奈米金粒所造成之加強的散射效應可以SPR進行，在此則以ELISA reader測量奈米金粒光譜特徵峰520 nm附近波長之吸收值作檢測。若目標分子越多，奈米金粒結合越多，散射效應增強，吸光值下降。第六圖即為以奈米金粒檢測DNA分子之DNA濃度與吸光值之關係圖。

綜上所述，本發明係提供一種結合RCA訊號放大系統之奈米探針的蛋白質微陣列光學檢測方法，其具有高靈敏度且可藉由一般傳統平台掃描器進行偵測。因此，本案實為一新穎、進步及實用之發明，爰依法提出申請。本發明得



五、發明說明 (13)

由熟習此技藝之人士任施匠思而為諸般修飾，然皆不脫如  
附申請專利範圍所欲保護者。



## 圖式簡單說明

### 圖式簡單說明

第一圖：其係顯示本發明之蛋白質微陣列光學檢測方法。

第二圖：其係為本發明之奈米金粒之TEM圖。

第三圖：其係為本發明之經寡核苷酸修飾後之奈米金粒光譜分析圖。

第四圖：其係為本發明之訊號放大後奈米金粒之TEM圖

第五圖：其係為本發明之RCA放大產物之電泳圖。

第六圖：其係為以本發明奈米金粒檢測DNA分子之DNA濃度與吸光值之關係圖。

### 圖式符號說明

10：蛋白質微陣列

12：連結分子

21：引子

31：環形模板

401：單股寡核苷酸

51：以0 x probe修飾

53：以1 x probe修飾

11：生物分子

20：捕捉分子

30：DNA聚合酶

40：奈米金粒探針

402：奈米金粒

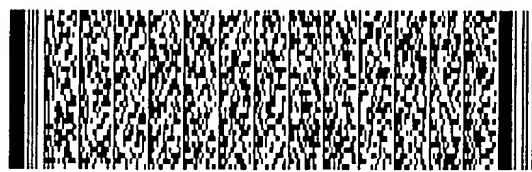
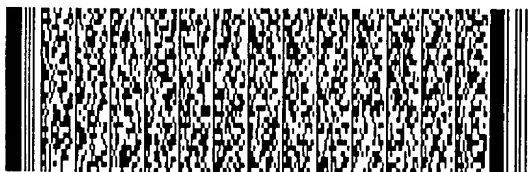
52：以1/2 x probe修飾

54：以2 x probe修飾



## 六、申請專利範圍

1. 一種蛋白質微陣列光學檢測方法，係包含下列步驟：  
提供一捕捉分子；  
以該捕捉分子辨識該蛋白質微陣列上之一生物分子；  
提供一引子，並與該捕捉分子連接；  
利用一滾動環形放大系統將該捕捉分子上之該引子之訊號放大；以及  
以一奈米金粒探針偵測經放大之該引子之訊號。
2. 如申請專利範圍第1項所述之方法，其中該捕捉分子為抗體、生物標示分子，如腫瘤標示分子、蛋白質接受體、糖基、或胜肽。
3. 如申請專利範圍第1項所述之方法，其中該生物分子為抗原、配基分子、蛋白質、糖基、或胜肽。
4. 如申請專利範圍第1項所述之方法，其中該引子為一單股寡核苷酸，其序列片段長度為20～80 bp，較佳為25～45 bp。
5. 如申請專利範圍第1項所述之方法，其中該引子之5'端修飾有胺基，以與該捕捉分子連接。
6. 如申請專利範圍第1項所述之方法，其中該滾動環形放大系統包含一DNA聚合酶、一環形模板及一核苷酸原料。
7. 如申請專利範圍第6項所述之方法，其中該環形模板具有與該引子互補之序列，而可與該引子雜合。
8. 如申請專利範圍第7項所述之方法，其中該滾動環形放大系統係藉由該DNA聚合酶之作用，產生一連接於該引子之具多個與該環形模板之序列互補之重複片段的DNA分



## 六、申請專利範圍

子。

9. 如申請專利範圍第6項所述之方法，其中該環形模板之核苷酸序列片段長度為25~100 bp，較佳為30~50 bp。
10. 如申請專利範圍第1項所述之方法，其中該奈米金粒探針係為一以一單股寡核苷酸修飾之奈米金粒。
11. 如申請專利範圍第10項所述之方法，其中該單股寡核苷酸之序列片段長度為10~60 bp，較佳為15~25 bp。
12. 如申請專利範圍第10項所述之方法，其中該單股寡核苷酸之5'端修飾有-SH基，其與該奈米金粒表面具強反應性。
13. 如申請專利範圍第10項所述之方法，其中該奈米金粒係為圓形或多面體型。
14. 如申請專利範圍第10項所述之方法，其中該奈米金粒係以下列方法製得：
  - a. 將一玻璃器皿以王水浸泡，再以去離子水洗淨後烘乾；
  - b. 製備 $\text{HAuCl}_4$ 水溶液，並進行加熱回流至煮沸；
  - c. 快速加入一還原劑，以還原金離子成金；
  - d. 俟該水溶液顏色轉變為暗紅色，再繼續回流15分鐘後，置於冰上冷卻；以及
  - e. 以一過濾器過濾，或再進行透析除去鹽類等雜質後，儲存於4℃下而製得。
15. 如申請專利範圍第14項所述之方法，其中步驟c之該還原劑為檸檬酸鈉水溶液，且可依欲製備之該奈米金粒大



## 六、申請專利範圍

小不同而調整其添加量者。

16. 如申請專利範圍第15項所述之方法，當製備直徑約16 nm之該奈米金粒時，約需加入1 mL，1 %之該檸檬酸鈉水溶液。

17. 如申請專利範圍第14項所述之方法，其中步驟c之該還原劑為單寧酸，以還原製備粒徑小於5 nm之該奈米金粒。

18. 如申請專利範圍第14項所述之奈米金粒，其中該金粒之大小為1 nm到100 nm，較佳為5 nm到30 nm。

19. 如申請專利範圍第1項所述之方法，其中該生物分子係藉由一連結分子，其為C3～C12之烷鏈，一端修飾有-SH基，另一端則修飾-COOH基，並以SMPB、EDC/NHS作為反應交聯劑而固定於該微陣列上。

20. 一種蛋白質微陣列光學檢測系統，係包含：

一捕捉分子，係用以辨識該蛋白質微陣列上之一生物分子；

一引子，係與該捕捉分子連接；

一滾動環形放大系統，係用以放大該捕捉分子上之該引子之訊號；以及

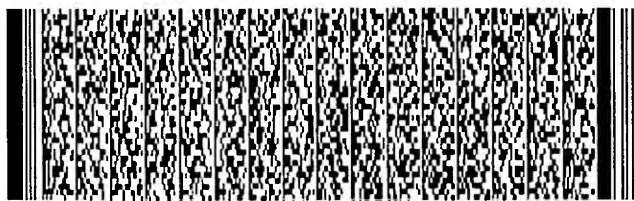
一奈米金粒探針，係用以偵測經放大之該引子之訊號。

21. 如申請專利範圍第20項所述之系統，其中該捕捉分子可為抗體、生物標示分子，如腫瘤標示分子、蛋白質接受體、糖基、或胜肽。



## 六、申請專利範圍

22. 如申請專利範圍第20項所述之系統，其中該生物分子為抗原、配基分子、蛋白質、糖基、或胜肽。
23. 如申請專利範圍第20項所述之系統，其中該引子為一單股寡核苷酸，其序列片段長度為20～80 bp，較佳為25～45 bp。
24. 如申請專利範圍第20項所述之系統，其中該引子之5'端修飾有胺基，以與該捕捉分子連接。
25. 如申請專利範圍第20項所述之系統，其中該滾動環形放大系統包含一DNA聚合酶、一環形模板及一核苷酸原料。
26. 如申請專利範圍第25項所述之系統，其中該環形模板具有與該引子互補之序列，而可與該引子雜合。
27. 如申請專利範圍第26項所述之系統，其中該滾動環形放大系統係藉由該DNA聚合酶之作用，產生一連接於該引子之具多個與該環形模板之序列互補之重複片段的DNA分子。
28. 如申請專利範圍第25項所述之系統，其中該環形模板之核苷酸序列片段長度為25～100 bp，較佳為30～50 bp。
29. 如申請專利範圍第20項所述之系統，其中該奈米金粒探針係為一以一單股寡核苷酸修飾之奈米金粒。
30. 如申請專利範圍第29項所述之系統，其中該單股寡核苷酸之序列片段長度為10～60 bp，較佳為15～25 bp。
31. 如申請專利範圍第29項所述之系統，其中該單股寡核



#### 六、申請專利範圍

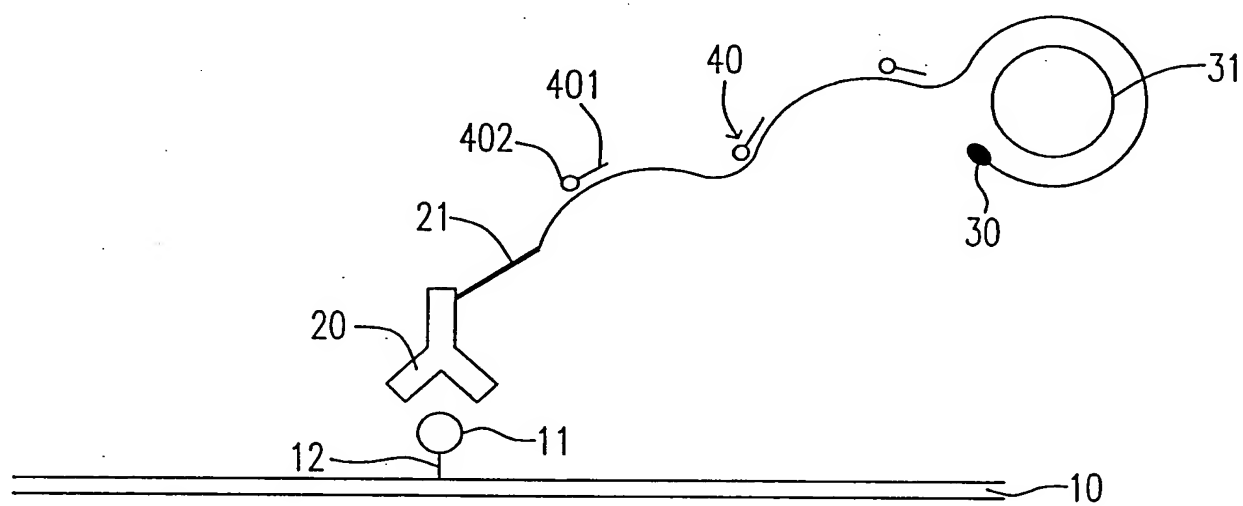
苷酸之5'端修飾有-SH基，其與該奈米金粒表面具強反應性。

32. 如申請專利範圍第29項所述之系統，其中該奈米金粒係為圓形或多面體型。

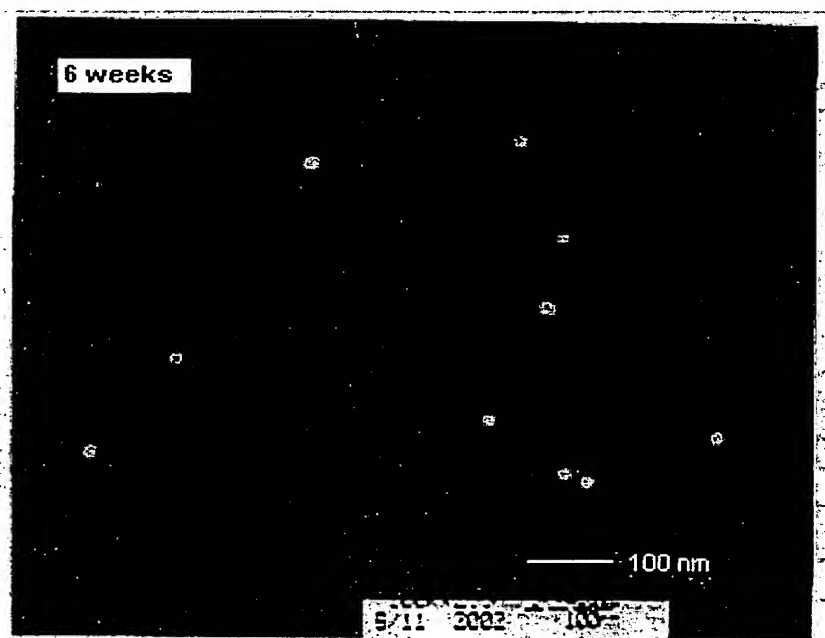
33. 如申請專利範圍第20項所述之系統，其中該生物分子係藉由一連結分子，其為C3～C12之烷鏈，一端修飾有-SH基，另一端則修飾-COOH基，並以SMPB、EDC/NHS作為反應交聯劑而固定於該微陣列上。



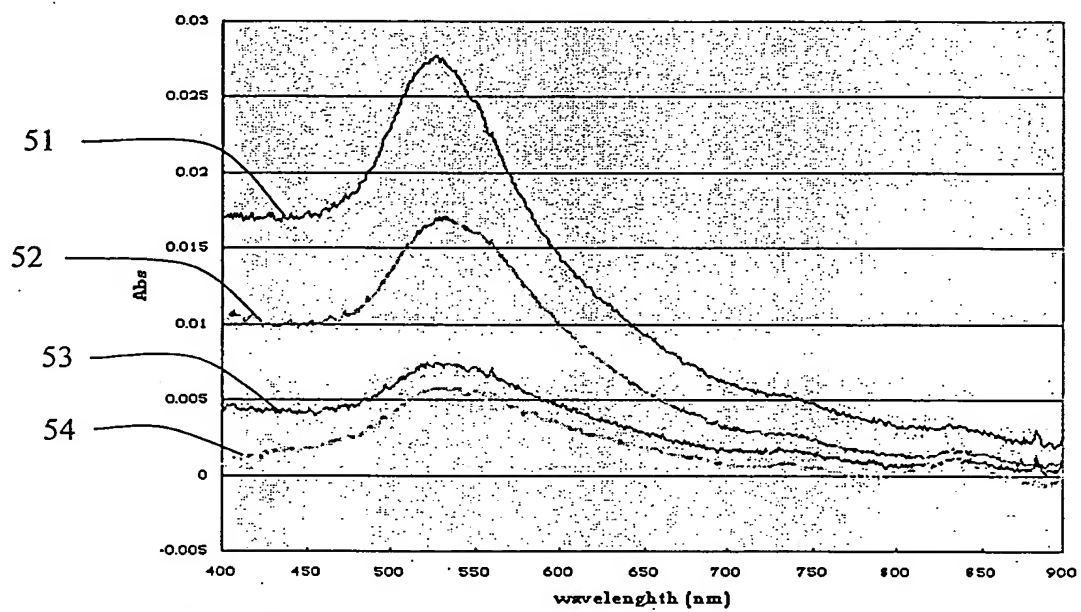




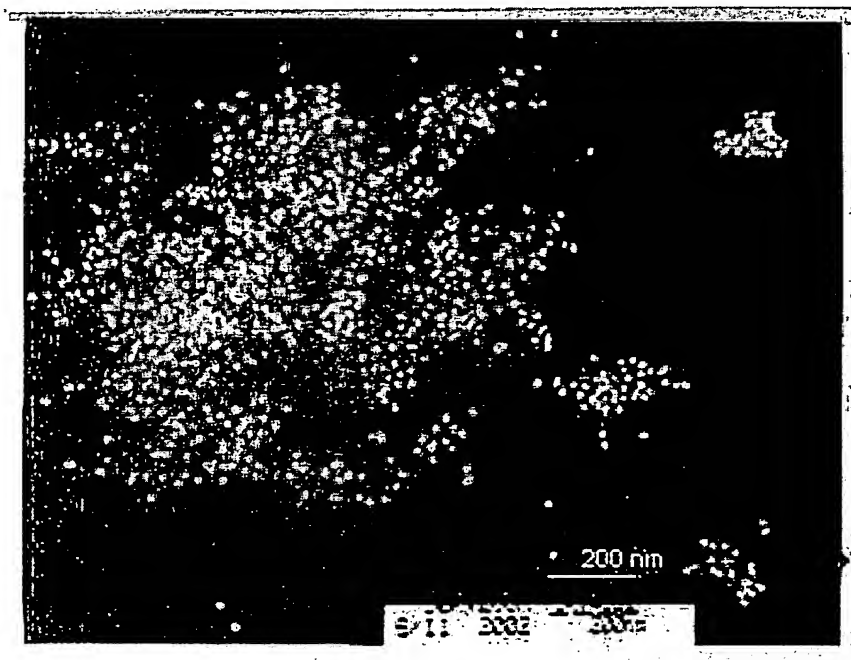
第一圖



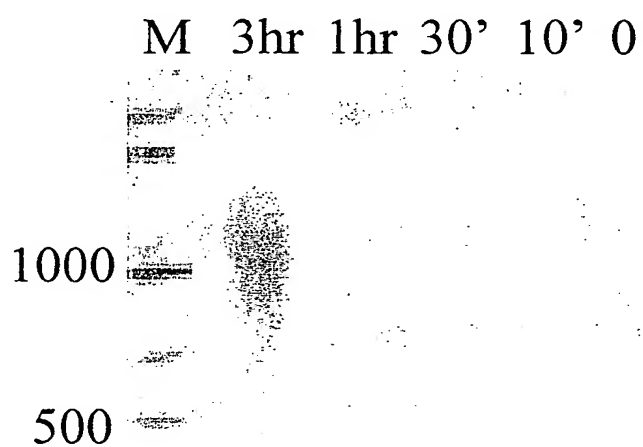
第二圖



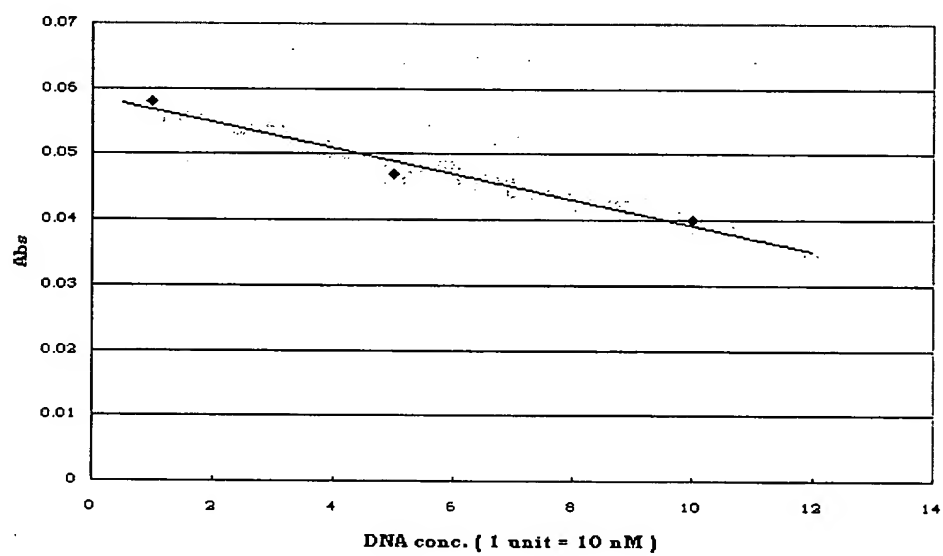
第三圖



第四圖



第五圖



第六圖

第 1/23 頁



第 1/23 頁



第 2/23 頁



第 2/23 頁



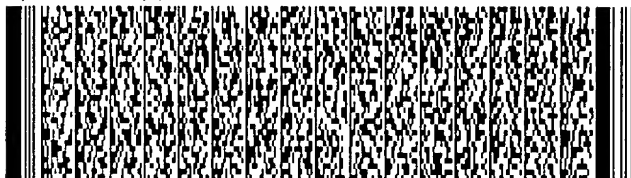
第 3/23 頁



第 4/23 頁



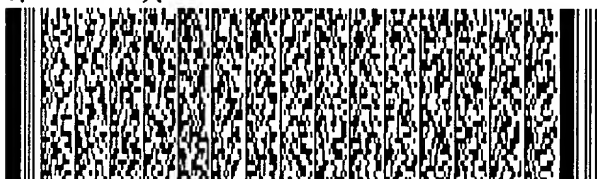
第 5/23 頁



第 5/23 頁



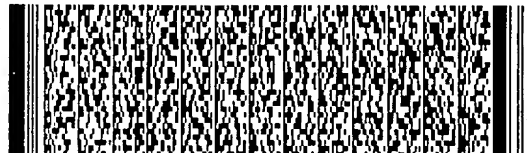
第 6/23 頁



第 6/23 頁



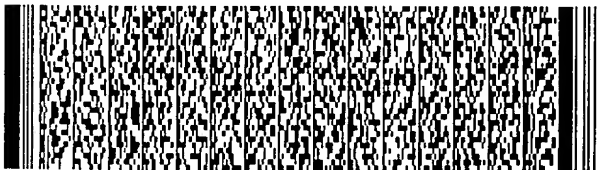
第 7/23 頁



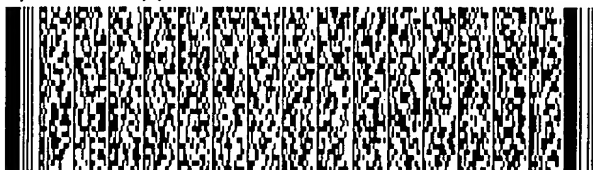
第 7/23 頁



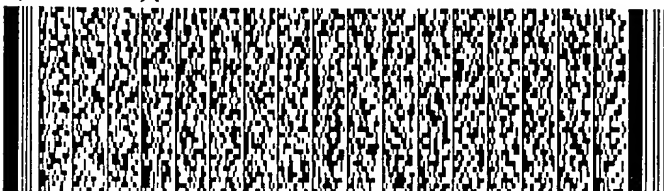
第 8/23 頁



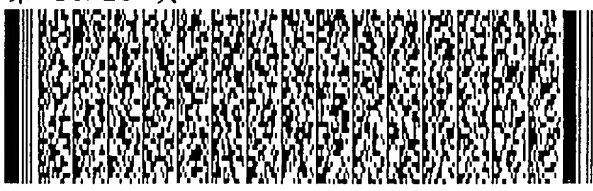
第 8/23 頁



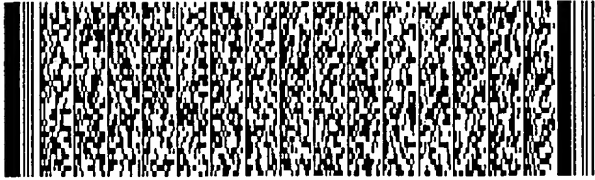
第 9/23 頁



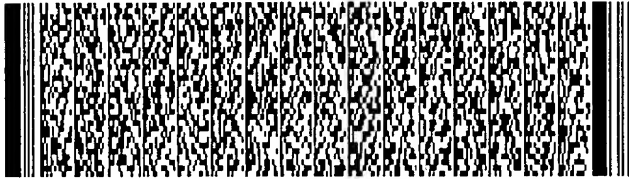
第 10/23 頁



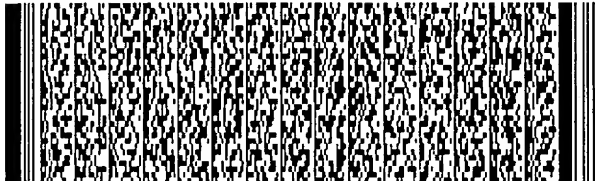
第 10/23 頁



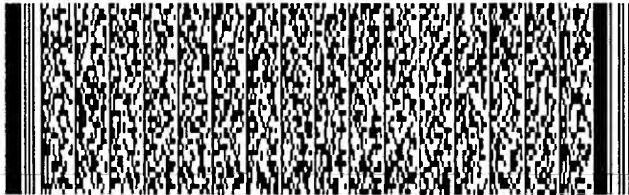
第 11/23 頁



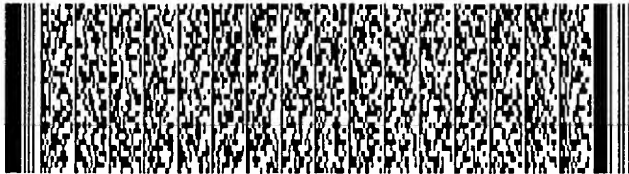
第 12/23 頁



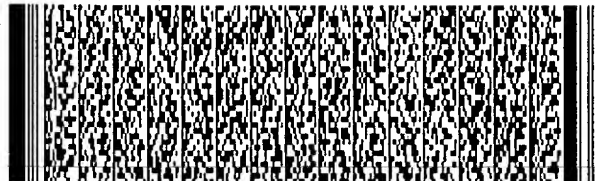
第 13/23 頁



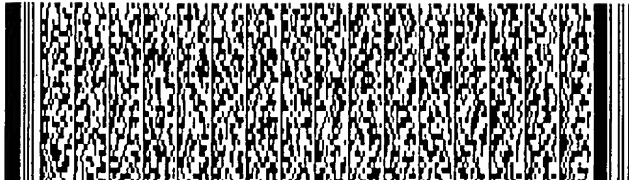
第 14/23 頁



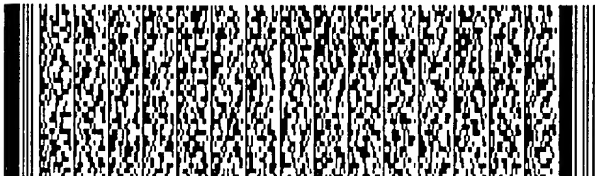
第 15/23 頁



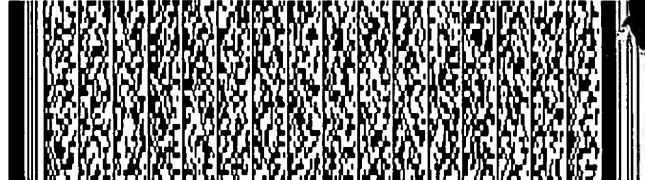
第 16/23 頁



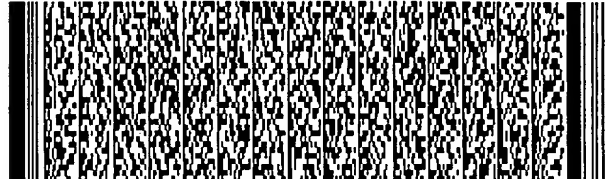
第 18/23 頁



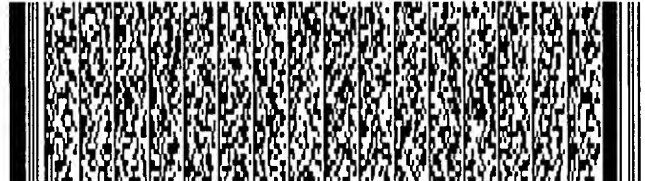
第 11/23 頁



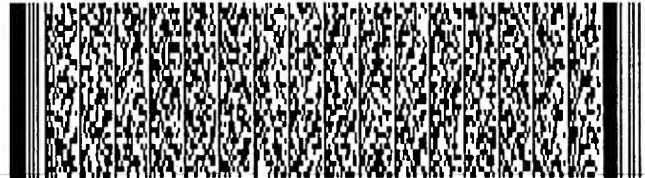
第 12/23 頁



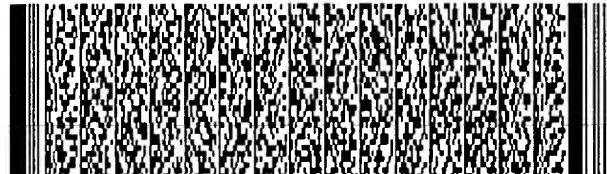
第 13/23 頁



第 14/23 頁



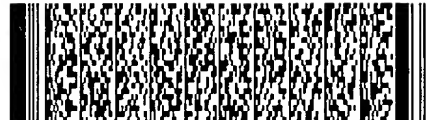
第 15/23 頁



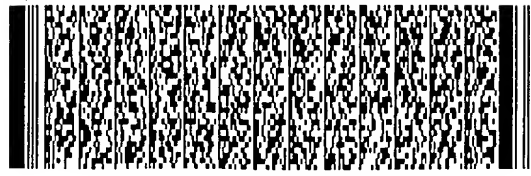
第 16/23 頁



第 17/23 頁

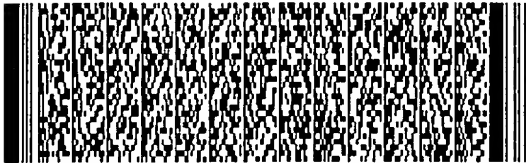


第 19/23 頁

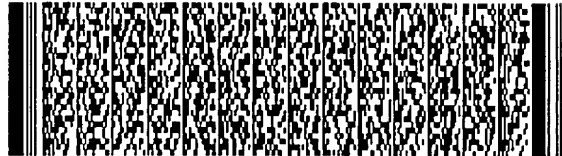




第 19/23 頁



第 20/23 頁



第 20/23 頁



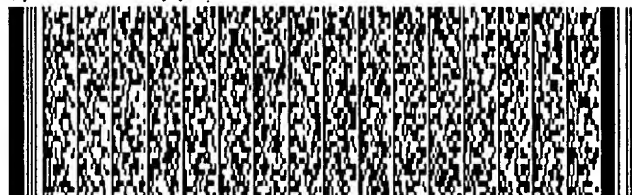
第 21/23 頁



第 21/23 頁



第 22/23 頁



第 23/23 頁

